

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **A. LATAR BELAKANG MASALAH**

Kembalinya minat masyarakat Indonesia untuk memakai bahan alami sebagai obat tradisional yang mudah didapat dan harganya terjangkau menjadi penyebab perlunya penelitian tentang kandungan kimia aktif yang terkandung di dalam tanaman dan perlu juga diketahui efek farmakologinya maupun efek samping dari zat aktif dari tanaman obat tersebut (Anonim, 1999).

Selama ini yang banyak digunakan obat tradisional dari bahan nabati yang merupakan tradisi turun temurun yang hanya berdasarkan dari orang terdahulu tanpa ada penelitian lebih lanjut dan lebih akurat mengenai zat aktif yang sebenarnya terdapat dalam bahan nabati tersebut sehingga perlu adanya penelitian ini agar nantinya dapat dikembangkan untuk mensintesis zat aktif dari tanaman tersebut. Penelitian yang ilmiah dan mendalam tentang tumbuhan obat mengenai zat aktifnya akan bermanfaat untuk pengembangan obat tradisional sehingga terjaminnya keamanan penggunaan dan dapat dipertanggungjawabkan (Anonim, 1999).

Penggunaan obat tradisional menjadi semakin meningkat akibat adanya kenaikan harga obat paten maupun generik. Di saat krisis moneter seperti ini dapat dimengerti bila banyak orang kembali memanfaatkan bahan-bahan alami (obat tradisional). Untuk mengantisipasinya Departemen Kesehatan Republik Indonesia telah memprioritaskan sembilan efek farmakologi yang terkandung dalam obat tradisional untuk mendampingi obat modern dan dimanfaatkan dalam

pelayanan kesehatan formal. Efek farmakologi yang diprioritaskan itu adalah pegal linu, diare, tambah darah, cacingan, kencing manis, malaria, urotilitas, hepatoprotektor, dan hiperlipideimea (Anonim, 1999).

Flavonoid merupakan kandungan khas tumbuhan hijau dan salah satu senyawa aktif yang menjadi perhatian peneliti dalam mengembangkan obat tradisional Indonesia (Markham, 1988).

Hal penting dari penyebaran flavonoid dalam tumbuhan adalah adanya kecenderungan kuat bahwa tetumbuhan yang secara taksonomi berkaitan akan menghasilkan flavonoid yang jenisnya serupa. Jadi informasi tumbuhan yang diteliti sering kali didapatkan dengan melihat pustaka mengenai flavonoid terdahulu dalam tumbuhan yang berkaitan, misalnya dari marga atau suku yang sama (Markham, 1988).

Salah satu tumbuhan yang dapat digunakan sebagai obat tradisional adalah tanaman anting-anting (*Acalypha australis* L.) yang oleh masyarakat dipergunakan sebagai obat diuretik (peluruh kencing), disentri basiler dan amuba, diare, malnutrisi, mimisan, muntah darah, kencing darah, malaria dan katarak. Penyebaran tumbuhan anting-anting di Indonesia sangat luas (Anonim, 2005).

Sehingga mempunyai banyak nama daerah. Penggunaan tanaman anting-anting sebagai bahan obat didasarkan atas pengalaman turun temurun dan belum didasarkan pada penelitian ilmiah mengenai kandungan zat aktif dari aktivitas biologisnya sehingga perlu dilakukan penelitian tentang kandungan zat aktif yang terdapat dalam tanaman anting-anting terutama kandungan flavonoidnya, sebab flavonoid merupakan zat yang bersifat berkhasiat sebagai obat (Anonim, 1999).

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi flavonoid dengan metode kromatografi lapis tipis dan spektrofotometri ultraviolet.

## **B. PERUMUSAN MASALAH**

1. Apakah Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan spektrofotometri UV-VIS dapat digunakan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi flavonoid dari daun anting-anting (*Acalypha australis* L.)?
2. Bagaimana struktur parsial senyawa flavonoid dari daun anting-anting (*Acalypha australis* L.)?

## **C. TUJUAN PENELITIAN**

Penelitian ini mempunyai tujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi kandungan flavonoid dari daun anting-anting (*Acalypha australis* L.) dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis dan spektrofotometri ultraviolet.

## **D. TINJAUAN PUSTAKA**

### **1. Uraian tentang tanaman anting-anting (*Acalypha australis* L.)**

#### **a. Nama lain :**

1).Sinonim : *Acalypha virgata* (Thunb.Non L).

*Acalypha pauci flora.*

*Acalypha chinesis*

(Anonim, 2005)

2). Nama daerah : ceka mas (Sumatra); lelatang, rumput bolong-bolong  
rumput kokosongan, kucing-kucingan (Jawa)

( Heyne, 1987)

3). Nama asing : tie xian (Anonim, 2005)

b. Taksonomi

Kedudukan tanaman anting-anting (*Acalypha australis* L.) dalam  
tanaman atau taksonomi tumbuhan diklasifikasikan ke dalam :

- 1). Kingdom : Plantae
- 2). Subkingdom : Tracheoblonta
- 3). Superdivision : Spermatophyta
- 4). Divisia : Magnoliophyta (Angiospermes)
- 5). Class : Magnoliopsida (Dicotyledones)
- 6). Subclass : Rosidae
- 7). Order : Euphorbiales
- 8). Genus : *Acalypha* L (*Acalypha copperleaf*)
- 9). Familia : Euphorbiaceae
- 10). Species : *Acalypha australis* L

(Anonim, 2005)

c. Morfologi Tumbuhan

Habitus : Gulma yang tumbuh liar di pinggir jalan, lapangan atau  
lereng bukit. Herba semusim, tegak berambut, halus.

Batang : Tinggi 30-50 cm bercabang

- Daun : Garis memanjang kasar sampai lanset, bagian ujung dan pangkal daun lancip tapi bergerigi. Panjang 2,5 – 8 cm; lebar 1,5 cm. Helaian daun berbentuk bulat telur, tunggal bertangkai panjang letak tersebar, warnanya hijau.
- Bunga : Bunga majemuk berkelamin tunggal dan berumah satu, keluar dari ketiak daun, bunga kecil-kecil dalam rangkaian bunga malai/bulir
- Buah : Buah kotak, bulat, hitam, kecil.
- Biji : Bulat panjang coklat
- Akar : Akar tunggang warna putih kotor.

(Anonim, 2005)

d. Kandungan kimia

Tanaman anting-anting (*Acalypha australis* L.) mempunyai kandungan kimia yang bermanfaat bagi manusia, batang dan akar mengandung tanin dan saponin. Daun mengandung flavonoid dan juga minyak atsiri (Dalimartha, 2001).

e. Sifat dan khasiat tanaman

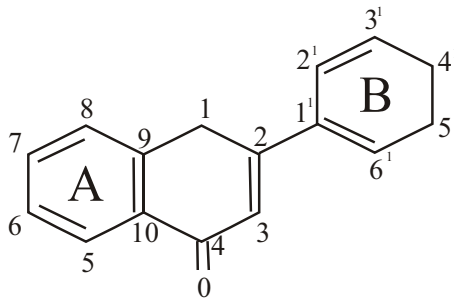
Daun anting-anting (*Acalypha australis* L.) mempunyai rasa yang pahit dan dingin. Daun anting-anting (*Acalypha australis* L.) berkhasiat sebagai adstrigen (hemostatik : menghentikan pendarahan), antiradang, antibiotik, diuretik (peluruh air seni), pengobatan pada disentri basiler dan amuba, diare, malnutrisi, mimisan, muntah darah, kencing darah dan malaria (Anonim, 2005).

## 2. Uraian tentang flavonoid

### a. Pengertian dan kerangka dasar Flavonoid

Senyawa flavonoid adalah senyawa poli fenol yang mempunyai 15 atom karbon yang tersusun dalam konfigurasi C6 – C3 – C6, yaitu dua cincin yang dihubungkan oleh 3 atom karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga. Flavonoid terdapat dalam semua tumbuhan hijau sehingga dapat ditemukan pada setiap tumbuhan (Markham, 1988).

Kelas-kelas yang berlainan dengan golongan ini dibedakan berdasarkan cincin heterosiklik-oksigen tambahan dan gugus hidroksil yang tersebar menurut pola yang berlainan. Flavonoid sering terdapat sebagai glikosida. Golongan dasar flavonoid berciri mempunyai cincin piran yang menghubungkan rantai tiga karbon, dengan salah satu dari cincin benzen. Sistem penomoran untuk flavonoid tersaji pada gambar 1 di bawah ini



**Gambar 1. Penomoran Flavonoid (Robinson, 1995)**

### b. Penyebaran flavonoid

Flavonoid merupakan kandungan khas tumbuhan hijau dengan pengecualian alga dan hornwort. Flavonoid sebenarnya terdapat pada

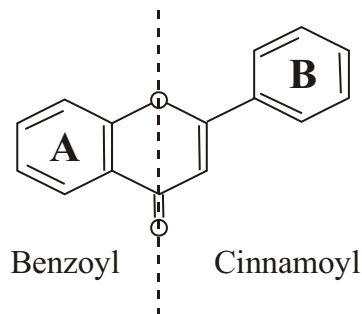
semua bagian tumbuhan termasuk, daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, nektar, bunga, buah, dan biji (Markham, 1988).

Flavonoid terdapat dalam semua tumbuhan berbuluh tetapi beberapa kelas lebih tersebar dari pada yang lainnya. Flavon dan flavonol terdapat pada semesta, sedangkan isoflavon dan biflavonol hanya terdapat pada beberapa suku tumbuhan. Sifat berbagai golongan flavonoid tersaji pada table 1 (Harborne, 1996). Kerangka flavonoid cincin benzoyl dan cinnamoyl tersaji pada gambar 2 (Mabry, *et al.*, 1970).

**Tabel 1. Sifat berbagai golongan Flavonoid (Harborne, 1996)**

Golongan Flavonoid	Penyebaran	Ciri Khas
Antosianin	Pigmen bunga merah marak, merah senduduk, dan biru, juga dalam daun dan jaringan lain.	Larut dalam air, $\lambda$ maks 515-545 nm, bergerak dengan BAA pada kertas
Proantosianidin	Terutama tak berwarna, dalam galih dan daun tumbuhan berkayu.	Menghasilkan antosianidin (warna dapat diekstraksi dengan amil alkohol) bila jaringan dipanaskan dalam HCl 2M selama setengah jam
Flavonol	Terutama ko-pigmen tak warna dalam bunga sianik dan asianik, tersebar luas dalam daun.	Setelah hidrolisis, berupa bercak kuning murup pada kromatogram forestall bila disinari dengan sinar UV maksimal spektrum pada 350 – 386 nm
Flavon	Seperti Flavonol	Setelah dihidrolisis, berupa bercak coklat redup pada kromatogram forestall, maksimal spektrum pada 330 – 350 nm
Glikoflavon	Seperti Flavonol	Mengandung gula yang terikat melalui ikatan C-C bergerak dengan pengembang air, tidak seperti flavon biasa

Biflavonil	Tanwarna, hampir seluruhnya terbatas pada gymnospermae	Pada kromatogram BAA berupa bercak redup dengan $R_F$ tinggi.
Khalkon dan auron	Pigmen bunga kuning, kadang terdapat juga dalam jaringan lain.	Dengan ammonia berwarna merah (perubahan warna dapat diamati <i>in situ</i> ), maksimal spektrum 370 – 410 nm
Flavonon	Tanwarna, dalam daun dan buah (terutama dalam citrus)	Berwarna merah kuat dengan Mg/HCl kadang – kadang sangat pahit.
Isoflavon	Tanwarna, sering kali, dalam akar, hanya terdapat dalam satu suku leguminosae	Bergerak pada kertas dengan pengembang air; tak ada uji warna yang khas.



**Gambar 2. Kerangka flavonoid cincin benzoyl dan cinnamoyl (Mabry, *et al.*, 1970)**

c. Penggolongan flavonoid

Penggolongan flavonoid berdasarkan pada substituen cincin heterosiklik yang mengandung oksigen dan perbedaan distribusi dari gugus hidroksil. Perbedaan oksidasi di bagian atom C menentukan sifat, khasiat, dan golongan atau tipe dari flavonoid (Markham, 1988).

Flavonoid terdapat dalam tumbuhan sebagai campuran, jarang sekali dijumpai hanya flavonoid tunggal dalam jaringan tumbuhan.



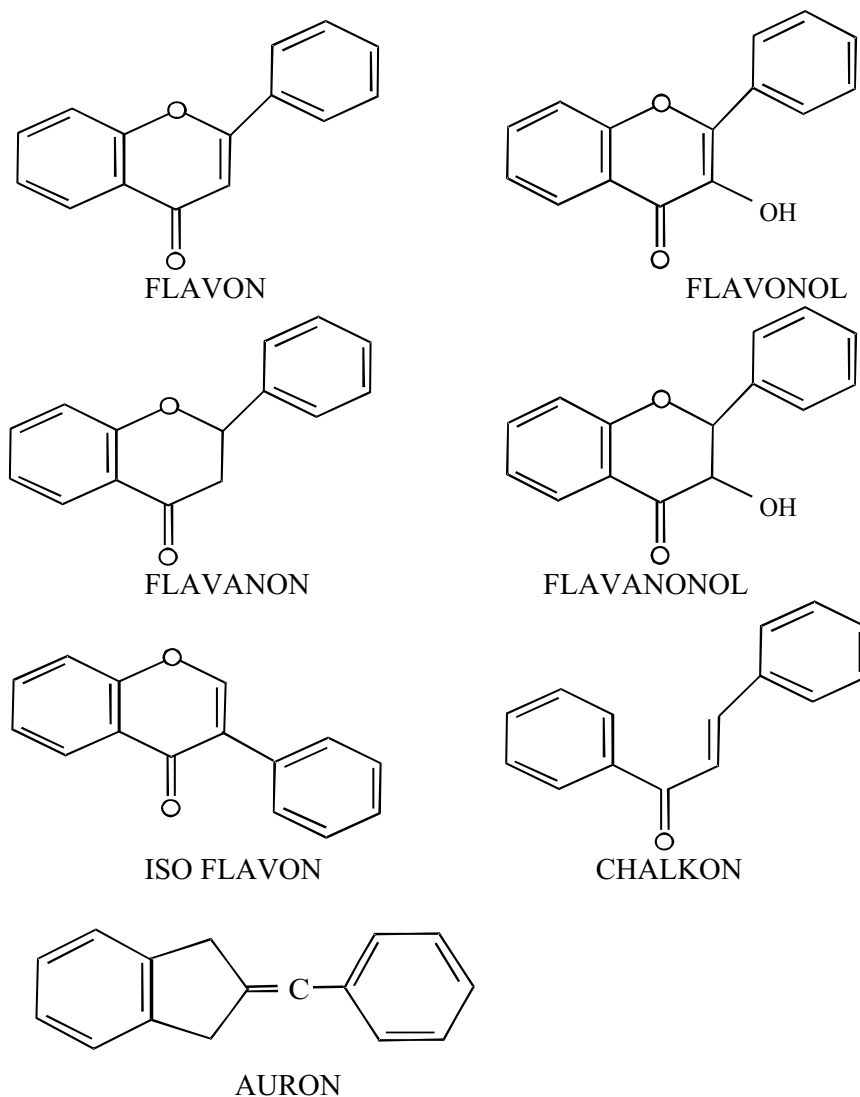
Disamping itu sering terdapat campuran yang terdiri atas flavonoid yang berbeda kelas (Harborne, 1996).

Semua flavonoid merupakan turunan senyawa induk flavon yang terdapat berupa tepung putih pada tumbuhan primula dan semuanya mempunyai sejumlah sifat yang sama (Harborne, 1987)

Penggolongan jenis flavonoid dalam jaringan tumbuhan mula-mula didasarkan kepada telaah sifat kelarutan dan reaksi warna. Kemudian diikuti dengan pemeriksaan ekstrak tumbuhan yang telah dihidrolisis secara kromatografi satu arah dan pemeriksaan ekstrak etanol secara dua arah. Akhirnya flavonoid dapat dipisahkan dengan kromatografi. Komponen masing-masing diidentifikasi dengan membandingkan kromatografi dan spektra dengan memakai senyawa pembanding yang sudah dikenal. Senyawa baku yang ditemukan sewaktu menelaah membutuhkan pemeriksaan kimia dan spektrum yang lebih terperinci (Harborne, 1987)

Struktur berbagai tipe golongan flavonoid bervariasi sesuai dengan kerangka dasar heterosiklik beroksigen yang dapat berupa gamapiron, piran atau pirilium. Kecuali pada auron dan khalkon, siklisasi terjadi antara atom karbon di dekat cincin benzen (B) dan satu gugus hidroksi cincin A. Kelas-kelas yang berlainan pada flavonoid dibedakan berdasarkan cincin heterosiklik oksigen dan juga hidroksil yang tersebar menurut pola yang berlainan (Robinson, 1991).

Perbedaan di bagian rantai karbon nomor 3 menentukan klasifikasi dari senyawa flavonoid yaitu flavon, flavonol, flavanon, flavanonol, isoflavon, auron, khalkon. Struktur berbagai tipe flavonoid tersaji dalam gambar 3. Reaksi warna flavonoid (Venkataraman, 1962) tersaji pada tabel 11.



**Gambar 3. Struktur berbagai tipe flavonoid**

**Tabel II. Reaksi Warna Flavonoid (Venkataraman, 1962)**

Golongan Flavonoid	Warna			
	Larutan NaOH	HCl pekat	Magnesium/ asam klorida	Natrium amalgam
Khalkon	Jingga sampai merah	Jingga sampai merah	Tak warna	Kuning pucat
Dihidrokhalkon	Tak berwarna	Tak berwarna/ kuning	Tak berwarna	Kuning pucat
Auron	Merah/ Violet	Merah / Violet	Tak berwarna	Kuning pucat
Flavanon	Kuning/ jingga dipanaskan merah	Jingga	Merah/ Violet/ biru	Merah
Flavon	Kuning	Kuning/ jingga berpedar	Kuning/ jingga berpedar	Merah
Flavonol	Kuning/ jingga	Kuning/ jingga berpendar	Merah / Violet	Kuning/ merah
Flavanonol	Kuning berubah coklat	Kuning/ merah	Merah / Violet	Kuning/ coklat
Leukoantosianin	Kuning	Merah / Violet	Violet	Violet
Antosianin/ Antosianidin	Biru/ violet	Kuning/ jingga	Merah lalu memucat	Kuning/ jingga
Isoflavon	Kuning	Kuning	Kuning	Merah muda/ violet
Isoflavonon	Kuning	Kuning	Tak berwarna	Merah

### 3. Metode Penyarian

Aglikon flavonoid adalah polifenol yaitu bersifat agak asam, sehingga dapat larut dalam basa. Tetapi bila dibiarkan dalam larutan basa banyak yang akan terurai. Karena mempunyai sejumlah gugus hidroksi yang tersubstitusi, flavonoid merupakan senyawa polar, maka flavonoid larut dalam pelarut polar

seperti etanol, butanol, aseton, dan air. Adanya gula yang terikat pada flavonoid menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air sehingga campuran pelarut diatas dengan air merupakan pelarut yang baik untuk glikosida, sedangkan aglikon yang kurang polar seperti isoflavon, flavanon, flavon, dan flavonol yang termetoksilasi cenderung mudah larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform (Markham, 1988).

Penyarian merupakan peristiwa perpindahan massa zat aktif yang semua berada dalam sel, ditarik oleh cairan penyari sehingga zat aktif larut dalam cairan penyari. Pada umumnya penyarian akan bertambah baik apabila permukaan serbuk simplisia yang bersentuhan dengan penyari semakin luas. Cara penyarian dapat dibedakan menjadi infudasi, maserasi, perkolasi, dan soxhletasi (Anonim, 1986) yaitu :

a. Infudasi

Infusa adalah sediaan cair yang dibuat dengan menyari simplisia dengan air pada suhu 90°C selama 15 menit. Infudasi adalah proses penyarian yang umumnya digunakan untuk menyari zat kandungan aktif yang larut dalam air dari bahan-bahan nabati. Penyari dengan cara ini menghasilkan sari yang tidak stabil dan mudah tercemar oleh kuman dan kapang. Oleh sebab itu sari yang diperoleh dengan cara ini tidak boleh disimpan lebih dari 24 jam (Anonim, 1986)

b. Maserasi

Maserasi merupakan cara penyarian sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam campuran penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk dalam

rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel, maka larutan yang pekat akan terdesak keluar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel (Anonim, 1986).

Maserasi digunakan untuk menyari simplisia yang mengandung zat aktif yang mudah larut dalam dalam cairan penyari, tidak mengandung zat yang mudah mengembang dalam cairan penyari, tidak mengandung benzoin, stirak, dan lain-lain (Anonim, 1986).

Keuntungan cara penyarian dengan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan, sedang kerugiannya adalah membutuhkan waktu yang relatif lama dan penyariannya kurang sempurna (Anonim, 1986)

#### c. Perkolasi

Perkolasi adalah cara penyarian yang dilakukan dengan mengalirkan cairan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi. Kekuatan yang berperan dalam perkolasi antara lain gaya berat, daya larut, tegangan permukaan, difusi osmosa, adhesi, daya kapiler, dan gaya geseran (friksi) (Anonim, 1986).

Perkolasi dilakukan dalam wadah berbentuk silindris / kerucut (perkolator) yang memiliki jalan masuk dan keluar yang sesuai. Bahan pengekstraksi dialirkan secara berkesinambungan akan terjadi proses maserasi berulang-ulang. Jika pada maserasi sederhana terjadi ekstraksi yang sempurna dari simplisia, karena akan terjadi keseimbangan

konsentrasi antara larutan dalam sel dengan cairan di sekelilingnya. Pada perkolasi melalui suplai bahan pelarut segar, perbedaan konsentrasi tidak selalu dipertahankan, sehingga terjadi ekstraksi yang sempurna (Voight, 1995).

d. Soxhletasi

Soxhletasi adalah proses pemisahan suatu senyawa dari bahan-bahan tumbuhan yang bertujuan untuk menghilangkan senyawa yang mempunyai polaritas rendah, seperti klorofil, lemak, dan terpen yang dikhawatirkan dapat mengganggu proses isolasi flavonoid. Soxhletasi/ekstraksi berkesinambungan merupakan metode yang sederhana yaitu dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan etil asetat untuk menarik flavonoid yang sesuai dengan kepolaran dari masing-masing pelarut, sehingga senyawa yang non polar dan semi polar masuk ke fraksi yang non polar/semi polar, sedangkan senyawa yang polar akan masuk ke fraksi polar (Anonim, 1986).

Cairan penyari diisikan pada labu, serbuk simplisia diisikan pada tabung dan kertas saring atau tabung yang berlubang-lubang dari gelas, baja tahan karat, atau bahan lain yang cocok. Cairan penyari dipanaskan hingga mendidih. Uap cairan penyari naik ke atas melalui pipa samping kemudian diembungkan kembali oleh pendingin tegak. Cairan turun ke labu melalui tabung yang berisi serbuk simplisia cairan penyari sambil turun melarutkan zat aktif serbuk simplisia karena adanya sifon maka setelah cairan mencapai permukaan sifon, seluruh cairan akan kembali ke labu

**Keuntungan :**

1. Cairan penyari yang diperlukan lebih sedikit dan secara langsung diperoleh hasil yang lebih pekat.
2. Serbuk simplisia disari oleh cairan penyari yang murni, sehingga dapat menyari zat aktif lebih banyak.
3. Penyari dapat diteruskan sesuai dengan keperluan tanpa menambah volume cairan penyari (Anonim, 1986).

**Kerugian :**

1. Larutan dipanaskan terus-menerus, sehingga zat aktif yang tidak tahan pemanasan kurang cocok. Ini dapat diperbaiki dengan menambahkan peralatan untuk mengurangi tekanan udara.
2. Cairan penyari dididihkan terus-menerus, sehingga cairan penyari yang baik harus murni / campuran azeotrop (Anonim, 1986).

**4. Kromatografi Lapis Tinggi (KLT)**

Kromatografi lapis tipis merupakan salah satu cara pengujian yang utama dalam standarisasi simplisia. Cara ini mempunyai kepekaan yang tinggi cepat sederhana dan relatif lebih murah hingga dapat dilakukan oleh berbagai pihak yang memerlukan (Pramono, 1989).

Prinsip kromatografi lapis tipis adalah fase diam ditempatkan pada penyangga yang sesuai (plat, logam, kaca atau lapisan yang cocok). Senyawa yang berupa larutan ditotolkan berupa bercak atau pita. Plat kemudian dimasukkan dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan penyangkut yang sesuai (fase gerak). Pemisahan yang terjadi selama perambatan kapiler, untuk senyawa yang tidak berwarna harus ditampakkan (Stahl, 1985).

a. Fase diam (lapisan penjerap)

Fase diam pada kromatografi lapis tipis adalah bahan penjerap atau adsorber. Sifat penting bahan penyerap adalah ukuran partikelnya serta homogenitasnya. Kedua sifat ini menentukan daya lekat pendukung. Panjang lapisan tersebut 200mm atau 100mm. Untuk analisa tebal 0,1mm – 0,3mm biasanya 0,2mm. Sebelum digunakan, lapisan disimpan dalam lingkungan yang tidak lembab dan bebas dari uap laboratoium. Penyerap yang umum adalah silika gel, alumunium oksida, selulosa, poliamid, dan lain-lain (Stahl, 1985).

b. Fase gerak (pelarut pengembang)

Fase gerak adalah medium angkut dan terdiri atas satu atau beberapa pelarut bergerak dalam fase diam, yaitu suatu lapisan berpori karena ada gaya kapiler. Pemilihan fase gerak tergantung pada faktor-faktor yang sama seperti dalam pemisahan dalam kromatografi kolom serapan. Sebaiknya menggunakan campuran pelarut organik yang mempunyai polaritas serendah mungkin (Sastrohamidjojo, 1991; Stahl, 1985).

c. Deteksi

Untuk deteksi senyawa yang dipisahkan cara paling sederhana adalah jika senyawa yang menunjukkan penyerapan di daerah UV gelombang pendek (254 nm) atau jika senyawa itu dapat dideteksi ke fluoresensi radiasi sinar UV gelombang panjang (366 nm). Jika dengan kedua cara ini tidak dapat dideteksi harus dicoba dengan reaksi kimia dengan atau tanpa pemanasan (Stahl, 1985).

d. Penilaian kromatogram



Jarak pengembangan senyawa pada kromatogram biasanya dinyatakan dengan harga  $R_f$  (Retrodiation Factor) atau  $hR_f$ , yang biasanya didefinisikan – sebagai :

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digunakan oleh pelarut dari titik asal}}$$

Angka  $R_f$  berjangka antara 0,00 harga dapat ditentukan dua desimal  $hR_f$  ialah  $R_f$  dikalikan faktor 100 (Stahl, 1985).

Faktor-faktor yang mempengaruhi gerakan dalam kromatografi lapis tipis yang mempengaruhi harga  $R_f$  :

- a. Struktur kimia dari senyawa yang dipisahkan
- b. Sifat dari fase diam
- c. Tebal dan kelarutan dari fase diam
- d. Pelarut fase gerak
- e. Kejenuhan dari uap dalam bejana pengimbangan
- f. Jumlah cuplikan yang digunakan
- g. Suhu

(Sastrohamidjojo, 1991)

Berbagai penafsiran bercak dari segi flavonoid tersaji pada tabel III (Mabry, *et al.*, 1970). Berbagai warna bercak flavonoid dengan sinar UV 366 tersaji pada tabel IV (Geissman, 1962).

**Tabel III. Penafsiran bercak dari segi struktur flavonoid (Mabry, *et al.*, 1970)**

Warna bercak flavonoid		Tipe flavonoid
Sinar UV	UV/ NH <sub>3</sub>	
Ungu gelap	Kuning, hijau-kuning atau hijau	a. Biasanya flavon yang mempunyai 5-OH dan 4'OH atau flavonol tersubstitusi pada 3-OH mempunyai 5-OH dan 4-OH b. Kadang-kadang 5-OH flavonon

		dan 4' OH khalkon tanpa OH pada cincin B
	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan warna	a. Flavon atau flavonol yang mempunyai 5-OH tetapi tanpa 4'-OH atau tersubstitusi b. Isoflavon, dihidroflavon dan beberapa flavanon yang mempunyai 5-OH
	Biru muda	Kadang-kadang 5-OH flavanon
	Merah atau jingga	Khalkon yang mempunyai 2- dan atau 4-OH bebas
Fluoresensi biru muda	Fluoresensi hijau-kuning atau hijau-biru	a. Flavon dan flavanon tanpa 5-OH bebas b. Flavonol tanpa 5-OH bebas tetapi mempunyai 3-OH tersubstitusi
	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	Isoflavon tanpa 5-OH bebas
	Fluoresensi terang biru muda	Isoflavon tanpa 5-OH bebas
Tak nampak	Fluoresensi biru muda	Isoflavon tanpa 5-OH bebas
Kuning redup dan kuning, atau Fluoresensi jingga	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	Flavonol yang mempunyai 3-OH bebas dan mempunyai atau tidak mempunyai 5-OH bebas
Fluoresensi kuning, hijau-kuning, hijau-biru	Jingga atau merah	Auron yang mempunyai 4' OH bebas dan beberapa 2- atau 4-OH khalkon
	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	a. Auron yang tidak mempunyai 4'OH bebas dan flavanon tanpa 5-OH bebas b. Flavonol yang mempunyai 3-OH bebas dan disertai atau tanpa 5-OH bebas
Kuning pucat	Kuning terang ungu	Dihidroflavonol yang tidak mempunyai 5-OH bebas

## **5. Spektroskopi Ultraviolet**

### **a. Tinjauan umum**

Spektroskopi adalah pengukuran serapan radiasi elektromagnetik panjang gelombang tertentu yang sempit, mendekati monokromatik yang diserap zat. Pengukuran serapan dapat dilakukan pada daerah ultraviolet

(panjang gelombang 190 nm – 380 nm). Meskipun spektrum pada daerah ultra violet dan daerah cahaya tampak dari suatu zat berguna untuk membantu identifikasi (Anonim, 1979).

Untuk melukiskan bagaimana radiasi elektromagnetik berinteraksi dengan benda adalah perlu memikirkan berkas sinar sebagai foton tenaga setiap foton berbanding langsung dengan frekuensi radiasi dan dalam hal ini dinyatakan dalam persamaan

$$E = h \cdot \nu = h \cdot c / n\lambda$$

Dimana :  $E$  = tenaga foton dalam erg

$\nu$  = frekuensi radiasi elektromagnetik dalam Hertz

$h$  = tetapan Planck  $6,624 \times 10^{-34}$  J – detik

Foton yang memiliki frekuensi yang tinggi (panjang gelombang pendek) mempunyai tenaga yang lebih tinggi dari foton yang berfrekuensi rendah (panjang gelombang panjang) (Sastrohamidjojo, 2001).

#### b. Spektroskopi UV untuk flavonoid

Spektroskopi serapan ultra violet dan serapan tampak barangkali merupakan cara tunggal yang paling berguna untuk menganalisis struktur flavonoid dan karena itu dibahas agak terinci disini. Cara tersebut digunakan untuk membantu mengidentifikasi flavonoid dan menentukan pola oksigenasi. Disamping itu, kedudukan gugus hidroksil fenol bebas pada inti flavonoid dapat ditentukan dengan menambahkan pereaksi (pereaksi geser) ke dalam larutan cuplikan dan mengamati pergeseran puncak serapan yang terjadi. Dengan demikian, secara tidak langsung

cara ini berguna untuk menentukan kedudukan gula atau metil yang terikat pada salah satu gugus hidroksil fenol.

Keuntungan utama cara ini adalah sangat sedikitnya jumlah flavonoid yang diperlukan untuk analisis lengkap (biasanya sekitar 0,1mg). Dalam praktek hanya sedikit peneliti yang dengan seksama menimbang cuplikan yang digunakan.

Flavonoid yang sudah dikenal dianalisis secara kuantitatif dengan memakai persamaan yang dikenal dengan hukum Beer-Lambert :

Persamaan Beer-Lambert :  $A = \epsilon \times c \times d$

Dalam persamaan  $A$  = daya serap atau keserapan dibaca pada spektrometer),  $\epsilon$  = absorptivitas mol yang dulu disebut koefisien ekstingsi mol,  $c$  = konsentrasi flavonoid dinyatakan dalam mol (gram/ bobot molekul) per liter, dan  $d$  = panjang sel (cm). Jadi, banyaknya flavonoid dalam larutan dapat diketahui bila kesemerapan mol diketahui. Himpunan kesemerapan mol yang baik telah dipublikasikan oleh Jurd (1962). Tetapi bila kesemerapan yang diperlukan tidak ada disini, dapat dihitung dengan mengukur keserapan larutan flavonoid yang sedang ditelaah (dapat dari sumber lain) yang konsentrasinya diketahui (Markham, 1988).

Spektrum flavonoid hanya ditentukan dalam larutan dengan pelarut metanol atau etanol (EtOH), meski perlu diingat bahwa spektrum yang dihasilkan dalam etanol kurang memuaskan. Spektrum khas terdiri atas dua maksimal pada rentang 240 – 285 nm (pita II) dan 300 – 550 nm

(pita I) (Markham, 1988). Rentang serapan spectrum UV-VIS flavonoid tersaji pada tabel V (Markham, 1988).

**Tabel V. Rentang serapan spektrum UV- tampak flavonoid (Markham, 1998)**

Pita II (nm)	Pita I (nm)	Jenis flavonoid
250 - 280	310 – 350	Flavon
250 - 280	330 – 360	Flavonol (3-OH tersubstitusi)
250 - 280	350 – 385	Flavonol (3-OH bebas)
245 - 275	310 - 330 bahu	Isoflavon
275 - 295	300 - 330 bahu	Flavonon dan dihidroflavonol
230 - 270	340 – 390	Chalkon
(kekuatan rendah) 230 - 270	380 – 430	Auron
(kekuatan rendah) 270 - 280	465 – 560	Antosianidin dan Antosianin

c. Pereaksi geser

Flavon dan flavonol :

1. Efek hidroksilasi

Penambahan gugus OH pada cincin A pada flavon/flvonol menghasilkan pergeseran batokromik yang nyata pada pita resapan I atau pita resapan II pada spektra flavonoid. Apabila gugus hidroksi tidak pada flavon atau flavonol, panjang gelombang maksimal muncul pada gelombang yang lebih pendek jika dibandingkan dengan adanya gugus 5-OH. Sedangkan subsitusi gugus hidroksi pada posisi 3, 5, 4' mempunyai sedikit efek atau tidak sama sekali pada spektra ultraviolet (Mabry, *et al.*, 1970).

## 2. Efek metilasi dan glikolisasi

Metilasi dan glikolisasi pada pola resapan dari flavon dan flavonol. Jika gugus 3, 5 atau 4' – OH pada flavon dan flavonol termetilasi atau terglukolisasi terjadi pergeseran hipsokromik, khususnya dapat dilihat pada pita serapan I, pergeseran yang terjadi sebesar 12-17 nm. Dapat juga mencapai 22-25 nm pada flavon yang tidak mempunyai gugus 5-OH (Mabry, *et al.*, 1970)

## 3. Efek natrium metoksida

Natrium metoksida pada flavon dan flavonol dalam metanol pada umumnya menghasilkan pergeseran batokromik pada semua pita serapan. Walaupun demikian pergeseran batokromik, yang besar pada serapan pita/sekitar 40-65 nm tanpa penurunan intensitas, menunjukkan adanya gugus-gugus 4'-OH bebas, dan flavonol yang tidak mempunyai gugus 4'-OH bebas juga memberikan pergeseran batokromik disebabkan adanya gugus 3-OH. Jika suatu flavonol mempunyai 3 dan 4'-OH bebas, maka spektranya dengan natrium metoksida akan mengalami dekomposisi. Pereaksi pengganti natrium metoksida yang cocok ialah larutan NaOH 2M dalam air (Mabry, *et al.*, 1970).

## 4. Efek natrium asetat

Natrium asetat merupakan basa lemah dan hanya akan mengionisasi gugus yang tingkat kesamaannya tinggi, khususnya untuk mendeteksi adanya gugus 7-OH bebas (Markham, 1988). Flavon dan flavonol

yang mempunyai gugusan 7-OH bebas menunjukkan pergeseran batokromik sebesar 5-20 nm pada pita serapan II dengan adanya natrium asetat. Natrium asetat hanya dapat mengionisasi khusus pada gugus 7-OH. Adanya asetat dan asam borat akan membentuk kompleks dengan gugus orto dihidroksi pada semua posisi kecuali atom C<sub>5</sub> dan C<sub>6</sub>. Flavon dan flavonol yang mempunyai gugus orto dihidroksi pada cincin B menunjukkan pergeseran batokromik pada serapan 1 sebesar 12-30 nm. Gugus orto dihidroksi pada cincin A juga dapat dideteksi dengan efek natrium asetat dan asam borat. Adanya pergeseran batokromik sebesar 5-10 nm pada pita 1 menunjukkan adanya gugus orto dihidroksi pada C<sub>6</sub> dan C<sub>7</sub>, atau C<sub>7</sub> dan C<sub>8</sub> (Mabry, *et al.*, 1970)

##### 5. Efek AlCl<sub>3</sub>

Karena membentuk kompleks tahan asam antara gugus hidroksil dan keton yang bertetangga dan membentuk kompleks tak tahan asam dengan gugus orto, pereaksi ini dapat digunakan untuk mendeteksi kedua gugus tersebut (Markham, 1988). Gugus OH pada C<sub>3</sub> dan C<sub>5</sub> pada flavon dan flavonol akan membentuk kompleks yang stabil dengan adanya AlCl<sub>3</sub> dengan gugus orto dihidroksi bersifat labil sehingga dengan penambahan asam akan terdekomposisi sedangkan kompleks antara AlCl<sub>3</sub> dengan -4 keto dan 3/5-OH tetap stabil dengan adanya asam. Adanya gugus orto dihidroksi pada cincin B dapat diketahui jika pada penambahan asam terhadap spektra kompleks



$\text{AlCl}_3$  menghasilkan pergeseran hipsokromik sebesar 30-40 nm pada pita 1 (atau pita 1a jika pita 1 terdiri dari 2 puncak). Dengan adanya pergeseran batokromik pada pita 1a (dalam  $\text{AlCl}_3/\text{HCL}$ ) dibandingkan dengan pita 1 (dalam metanol) 35-55nm, menunjukkan adanya 5-OH flavon atau flavonol 3-OH tersubstitusi (Mabry, *et al.*, 1970).

### **Isoflavon, flavanon dan dihidroflavonol**

Spektra ultraviolet isoflavon, flavanon dan dihidroflavonol dalam metanol memberikan bentuk yang mirip antara satu dengan yang lainnya. Senyawa golongan ini sedikit atau tidak mengalami konjugasi antara cincin A dan B. Spektra mereka sangat berbeda dengan flavon dan flavonol, pita serapan I, mempunyai intensitas yang lemah/ bahu sedangkan pita II intensitasnya kuat. Pita serapan II dari isoflavon biasanya antara 245-270 nm dan relatif tidak mempunyai efek pada cincin B dengan adanya hidroksiliasi, sementara pada pita serapan II dari flavanon dan dihiroflavonol antara 270-295 nm (Mabry, *et al.*, 1970)

#### **1. Natrium metoksida**

Dengan penambahan natrium metoksida spektra isoflavon yang mempunyai gugus OH pada cincin A akan memperlihatkan pergeseran batokromik baik pada pita I maupun pita II. Puncak pada spektra ultraviolet senyawa 3',4'- dihidroksi isoflavon dapat digunakan untuk menentukan bahwa dekomposisi yang berjalan cepat yang menunjukkan adanya 3',4'- dihidroksi isoflavon (Mabry, *et al.*, 1970)

## 2. Natrium asetat

Natrium asetat hanya dapat mengionisasi isoflavon khususnya pada gugus 7-OH. Gugus 3' atau 4'-OH pada isoflavon tidak dapat terionisasi, berbeda dengan kebanyakan flavon dan flavonol. Oleh sebab itu interpretasi terhadap pergeseran spektra isoflavon untuk penambahan natrium asetat menjadi sederhana. Adanya 7-OH isoflavon menyebabkan pergeseran batokromik 6-20 nm pada pita II setelah penambahan natrium asetat (Mabry, *et al.*, 1970).

## 3. Natrium asetat/asam borat

Gugus orto dihidroksi pada cincin B tidak dapat dideteksi dengan NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> pada spektra ultraviolet isoflavon, flavanon, dihidroflavonol karena kurang efektifnya konjugasi dengan kromofor utama. Meskipun demikian ada fakta yang menunjukkan bahwa gugus 6,7 dihidroksi pada cincin A isoflavon dan flavanon (mungkin juga dihidroflavonol) dapat dideteksi dengan adanya pergeseran batokromik 10-15 nm pada pita I setelah penambahan NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Mabry, *et al.*, 1970)

## 4. AlCl<sub>3</sub> dan AlCl<sub>3</sub>/HCL

Adanya gugus 3',4'- dihidroksi pada isoflavon, flavanon dan dihidroflavanol tidak dapat dideteksi dengan AlCl<sub>3</sub> karena cincin B mempunyai sedikit atau tidak ada konjugasi dengan kromofor utama.

Jika isoflavon, flavonol (dan mungkin dihidroflavonol) mengandung gugus ortodihidroksi pada posisi 6,7/7,8 maka spektra  $\text{AlCl}_3$  menunjukkan pergeseran batokromik (biasanya pada pita I maupun pada pita II) dengan membandingkan terhadap spektra  $\text{AlCl}_3/\text{HCL}$ . Pita serapan II spectra ultraviolet dari semua 5-OH isoflavon, flavanon dan dihidroflavanol dapat dideteksi dengan penambahan  $\text{AlCl}_3/\text{HCL}$  kecuali 2-karboksi; 5,7-dihidroksi isoflavon adanya gugus tersebut ditandai dengan pergeseran batokromik pada pita II 10-14 (relatif pada metanol). Spektra isoflavon, flavanon dan dihidroksiflavonol yang tidak mempunyai gugus 5-OH bebas tidak berefek setelah penambahan  $\text{AlCl}_3/\text{HCL}$  (Mabry, *et al.*, 1970).

#### **E. HIPOTESIS**

Flavonoid yang terkandung dalam daun anting-anting (*Acalypha australis* L.) dapat diisolasi secara kromatografi lapis tipis dan diidentifikasi struktur parsialnya berdasarkan data kromatogram, reaksi warna dan spektrometri ultraviolet.